

STABLE GRANULOCYTE COLONY STIMULATING FACTOR-CONTAINING PREPARATION

Patent Number: JP63146827
Publication date: 1988-06-18
Inventor(s): MACHIDA MINORU
Applicant(s):: CHUGAI PHARMACEUT CO LTD
Requested Patent: ☐ JP63146827
Application Number: JP19870178032 19870716
Priority Number(s):
IPC Classification: A61K37/02 ; A61K47/00
EC Classification:
Equivalents: JP2577743B2

Abstract

PURPOSE: To obtain the titled preparation containing granulocyte colony stimulating factor and at least one saccharide.
CONSTITUTION: A stable granulocyte colony stimulating factor (G-CSF)- containing preparation comprising 1pt.wt. G-CSF [e.g. human G-CSF having 19,000+ or -1,000 (by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis), at least one isoelectric point of pI=5.5+ or -0.1, pI=5.8+ or -0.1 and pI=6.1+ or -0.1 and an amino acid sequence from N end to 21st having a group shown by the formula] and 1-10,000pts.wt. at least one saccharide (e.g. glycerin, erythritol, heparin, dextrin, arginic acid etc.). The preparation can be used by various administration forms such as oral administration and parenteral administration such as many injections, etc. Adsorption on the wall of container can be prevented and consumption of expensive component can be hindered.

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-146827

⑬ Int. Cl.⁴A 61 K 37/02
47/00

識別記号

ABD
3 1 0
3 2 6
3 3 6

庁内整理番号

8615-4C

⑭ 公開 昭和63年(1988)6月18日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全7頁)

⑮ 発明の名称 安定な顆粒球コロニー刺激因子含有製剤

⑯ 特 願 昭62-178032

⑰ 出 願 昭62(1987)7月16日

優先権主張 ⑱ 昭61(1986)7月18日 ⑲ 日本(JP) ⑳ 特願 昭61-169487

㉑ 発 明 者 町 田 実 東京都豊島区高田3丁目41番8号 中外製薬株式会社内
㉒ 出 願 人 中外製薬株式会社 東京都北区浮間5丁目5番1号
㉓ 代 理 人 弁理士 越 場 隆

明 細 書

1. 発明の名称

安定な顆粒球コロニー刺激因子含有製剤

2. 特許請求の範囲

(1) 顆粒球コロニー刺激因子と少なくとも一種の製薬上許容される糖類とを含むことを特徴とする、安定な顆粒球コロニー刺激因子含有製剤。

(2) 上記糖を顆粒球コロニー刺激因子1重量部に対し1重量部～10,000重量部の範囲内の量で含有することを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の安定な顆粒球コロニー刺激因子含有製剤。

(3) 上記糖類が、グリセリン、エリスリトール、アラビトール、キシリトール、ソルビトール、マンニトール、グルクロン酸、イズロン酸、ガラクトロン酸、ノイラミン酸、グルコン酸、マンヌロン酸、ケトグルコール酸、ケトガラクト酸、ケト

グロン酸、ヒアルロン酸およびその塩、コンドロイチン硫酸およびその塩、ヘパリン、イヌリン、キチンおよびその誘導体、キトサンおよびその誘導体、デキストリン、平均分子量5,000～150,000のデキストラン、アルギン酸およびその塩からなる群から選ばれる少なくとも1種であることを特徴とする特許請求の範囲第1～2項のいずれか1項に記載の安定な顆粒球コロニー刺激因子含有製剤。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は顆粒球コロニー刺激因子含有製剤に関し、特に容器壁上への吸着または会合、重合、酸化等による活性成分の損失、不活性化を有利に防止し、安定化させた顆粒球コロニー刺激因子含有製剤に関するものである。

従来の技術

最近では各種感染症の化学療法等においては、

耐性菌発生、原因菌の交代現象、あるいは高い副作用などが臨床的に重大な問題となっており、そのため、例えば抗生物質、抗菌剤等による上記の如き化学的療法とは別に、感染菌宿主の防禦機能を活性化するような物質を用いることにより、上記化学療法の根本的な問題の解決を図ろうとする動きがある。即ち、例えば細菌感染の初期には宿主のもつ防禦機能のうちで白血球の貪食殺菌作用が最も強く影響すると考えられており、そこで好中球の増殖、分化成熟を促進することにより宿主の感染防禦機能の亢進を図ることが重要と考えられる。このような作用を示す極めて有用な物質の一つとして顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)があり、既にこれを用いた感染防禦剤が本出願人によって別途特許出願されている(特願昭60-23777号)。

発明が解決しようとする問題点

上記の如く、各種化学療法においては、各種の回避し得ない問題があり、そのために被感染体即

害を受け易く、温度、湿度、酸素、紫外線等に起因して会合、重合あるいは酸化などの物理的、化学的变化を生じて、大きな活性の低下を招く。

このことは、極めて微量の投与量のG-CSFを極めて正確に投与しようとする治療行為の完全な遂行を困難にする。そこでこのような問題点を解決し有効成分の活性の低下を十分に防止できる製品を開発する必要が生じる。本発明の目的は、このような点にあり、即ち安定なG-CSF含有製剤を提供することにある。

問題点を解決するための手段

本発明者等は上記目的とするG-CSF含有製剤の安定性を改善すべく種々検討・研究した結果、製薬上許容される糖類を添加することが有効であることを見出し、本発明を完成した。

即ち、本発明の安定なG-CSF含有製剤は、G-CSFと少なくとも1種の製薬上許容される糖類とを含有することとを特徴とする。

本発明におけるG-CSFは、例えば既に出願

ち宿主の防禦機能を賦活化し得るような物質を薬剤として用いる試みがなされている。

G-CSFは勿論、それ自身に宿主の防禦機能を賦活化する活性を有し、臨床上的治療効果をさらに十分に発揮すべく、上述した薬剤との併用の場合に於ても、その目的を遂行する上で極めて有用であることが判明した。

このG-CSFは極めて微量で使用され、通常成人一人当たり、0.1~500 μ g(好ましくは5~50 μ g)のG-CSFを含有する製剤を1~7回/週の割合で投与する。しかしながら、このG-CSFは、例えば注射用アンプル、注射器等の器壁に対し吸着性を示すことから、特にこの薬剤を水溶液等の注射薬として利用する場合には、アンプル等の容器、注射器等の器壁に吸着されてしまい、G-CSFの医薬としての活性を十分有効に発揮させることができず、あるいはこのような吸着に基づく損失分を予め見積って余分に医薬中に添加しておかねばならない。

その上、G-CSFは不安定で、外的因子の影響

されている特願昭59-153273号、同60-269455号、同60-269456号、同60-270838号、同60-270839号明細書に記載の各種方法に従って得ることができ、例えばヒトG-CSFは口腔底癌患者の腫瘍細胞から採取した細胞株(CNCM受託番号「I-315」、同「I-483」)の培養により、あるいは更にヒトG-CSFをコードする遺伝子を用いて組換え体DNAを作製し、これを適当な宿主細胞(例えば大腸菌、C127細胞、チャイニーズハムスターの卵胎細胞等)で発現させるなどによって得ることができる。

本発明におけるG-CSFとしては高純度に精製されたヒトG-CSFであれば全て使用できるが、ヒトG-CSF産生細胞を培養して得られる培養上清から単離して得られるもの及びヒトG-CSF活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子を組み込んだ組換えベクターで宿主を形質転換して得られる形質転換体が産生するヒトG-CSF活性を有するポリペプチドまたは糖蛋白質が好ましい。

具体的には、次の (i) 及び (ii) で示すヒト G-C S F が特に好ましく用いられる。

(i) 次の理化学的性質を有するヒト G-C S F。

①分子量：ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による測定で約 $19,000 \pm 1,000$ 。

②等電点： $pI = 5.5 \pm 0.1$ 、 $pI = 5.8 \pm 0.1$ 、 $pI = 6.1 \pm 0.1$ の三つの等電点のうち少なくとも1つを有する。

③紫外部吸収：280nmに極大吸収を有し、250nmに極小値を持つ。

④N末端から21残基目迄のアミノ酸配列が次の如くである。

H₂N-Thr-Pro-Leu-Gly-Pro-Ala-Ser-Ser-Leu-Pro-Gln-Ser-Phe-Leu-Leu-Lys-Cys-Leu-Glu-Gln-Val-

(ii) 下記のアミノ酸配列またはその一部で表わされるヒト顆粒球コロニー刺激因子活性を有するポリペプチド又はこれと糖鎖部を有する糖蛋白質を含有するヒト G-C S F。

(Met). Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu

Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln Glu Lys Leu (Val Ser Glu). Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro (但し m は 0 又は 1 を表わし、n は 0 又は 1 を表わす)。

なおこれらの G-C S F の詳細な製造方法については、本出願人が先に出願した特願昭59-153273号、特願昭60-269455号、特願昭60-269456号、

特願昭60-270838号、特願昭60-270839号明細書を参照されたい。

又、その他の方法として G-C S F 産生細胞と自己増殖能を有する悪性腫瘍細胞とを細胞融合して得られるハイブリドーマをマイトジェンの存在下または不在下で培養することによって得ることができる。

これ等の方法で得られたヒト G-C S F 含有液は必要により公知の手段でさらに精製、濃縮した後凍結保存とするかまたは凍結乾燥などの手段により水分を除去して保存することができる。

このようにして得たヒト G-C S F は全て本発明によって安定な G-C S F 含有製剤とすることができる。

本発明の安定な G-C S F 含有製剤を得るのに使用する糖類としては、単糖類、オリゴ糖、多糖類並びにこれらのリン酸エステルあるいはヌクレオチド誘導体などがいずれも利用でき、製薬上許容されるものであれば特に制限はない。典型的な例を挙げればグリセリン、エリスリトール、アラ

ビトール、キシリトール、ソルビトール、マンニトールなどの3価以上の糖アルコール；グルクロン酸、イズロン酸、ノイラミン酸、ガラクトロン酸、グルコン酸、マンヌロン酸、ケトグルコール酸、ケトガラクト酸、ケトグロン酸などの酸性糖；ヒアルロン酸およびその塩、コンドロイチン硫酸およびその塩、ヘパリン、イヌリン、キチン並びにその誘導体、キトサンおよびその誘導体、デキストリン、分子量 5,000~15,000 のデキストラン並びにアルギン酸およびその塩などがあり、いずれも有利に使用でき、これらは単独であるいは2種以上の混合物として添加できる。

これらの糖類は一般に G-C S F 1 重量部に対し 1 重量部~10,000 重量部の範囲内で使用することが好ましい。

更に本発明の G-C S F 含有製剤は、その製剤化の目的に応じて希釈剤、溶解補助剤、等張化剤、賦形剤、pH調整剤、無痛化剤、緩衝剤、含硫還元剤、酸化防止剤等を含有してもよい。例えば、含硫還元剤としては、N-アセチルシステイン、N

ーアセチルホモシスチン、チオクト酸、チオジグリコール、チオエタノールアミン、チオグリセロール、チオソルビトール、チオグリコール酸およびその塩、チオ硫酸ナトリウム、グルタチオン、並びに炭素原子数1〜7のチオアルカン酸などのスルフヒドリル基を有するものなどを例示できる。

また、酸化防止剤としてはエリソルビン酸、ジブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒドロキシアニソール、 α -トコフェロール、L-アスコルビン酸およびその塩、L-アスコルビン酸パルミテート、L-アスコルビン酸ステアレート、亜硫酸水素ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、没食子酸トリアミル、没食子酸プロピルあるいはエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(EDTA)、ピロリン酸ナトリウム、メタリン酸ナトリウムの如きキレート剤などを例示できる。

あるいはまた賦形剤として、グリシン、シスチン、スレオニン、シスチン、トリプトファン、メチオニン、リジン、ヒドロキシリジン、ヒスチジン、アルギニンなどのアミノ酸を添加してもよ

い。

本発明の安定化されたG-C S F含有製剤は経口、各種注射などの非経口等各種の投与形式で使用でき、該投与形式に応じた様々な剤形で実現できる。例えば、投与形としては錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤、懸濁液等の経口投与剤、あるいは静注、筋注、皮下注、皮内注用等の溶液、懸濁注射剤、凍結乾燥製剤あるいは、坐剤、経鼻剤、嚥剤等の経粘膜投与剤形を典型的なものとして例示できる。

作用

上記の如く、感染症等の化学的療法においては、抗生物質、抗菌剤等の薬剤の他、患者の抵抗力、活性などといった免疫応答力にもとずいた防禦機能自体をも同時に改善するために、この目的で有効な成分を添加併用することが臨床上極めて有用な手段であることが判明してきた。

この種の成分の一つであるG-C S Fは極めて微量で使用される。従って、G-C S Fを極低濃

度の水溶液等として取扱う場合には、例えば注射器等に入れたり、アンプル等の容器に収容して使用されることが多いが、このような場合に、上記の如き成分の容器、注射器等の器壁に対する吸着性が高いことから、これらの器壁等に吸着してしまい、薬液中での有効濃度を、あるいは所定単位用量中の成分の目的とする活性を維持することが困難であるといった問題がみられた。従って、有効量以上の量を、吸着により失われる量を考慮して、予め添加しておく必要があった。

更に、特にG-C S Fについてみると、これは不安定なものであり、温度、湿度、酸素、紫外線等の外的因子によって大きな影響を受け、会合、重合あるいは酸化などの物理的、化学的变化を生じ活性の低下を招く。

そこで、本発明ではG-C S F含有製剤に糖類を添加することにより上記諸問題点を解決した。この糖類の使用によるG-C S Fの安定化効果並びに容器壁等への付着損失防止効果の明確な機構は明らかではないが、糖類の存在下においては、

G-C S F分子各々が添加された糖中に分散され、その結果G-C S Fの分子間の相互作用が高度に緩和され、会合、重合等の確率が大幅に減じられ、また同時に、添加された糖により容器壁上の吸着表面とG-C S Fとの間に水和層が形成され、これにより吸着が防止され、これらの総合的な効果として安定性が著しく向上したのと考えた。

上記の吸着による損失、会合、重合、酸化等による活性低下の問題は、注射用溶液、懸濁剤などにおいて特に顕著であるが、その他の錠剤、カプセル剤等の製剤過程においてもみられる大きな問題であり、これらも本発明に従って糖類を使用することによって同様に解決できる。

このような理由から、糖類の添加量は、特にその下限は臨界的であり、G-C S F 1重量部に対し1重量部〜10,000重量部の範囲内の量で含有することが望ましい。

上記の如く、効果的に器壁等への吸着が防止でき、更に安定性を向上させ得ることは、微量成分としてのG-C S Fの有効利用を可能とし、更に

高価な成分の浪費が防止されることから、製品コストの低下を図ることにもつながる。

実施例

以下、実施例によって本発明を更に具体的に説明する。しかしながら、本発明は以下の例によって何等制限されるものではない。

尚、以下の実施例においてG-C S Fの残存活性の測定は以下の如く実施した。

(a) マウス骨髄細胞を用いる軟寒天法

ウマ血清 0.4ml、被検体 0.1ml、C 3 H / H e N (メス) マウスの骨髄細胞浮遊液 0.1ml (0.5~1 × 10⁶ 有核細胞)、寒天を0.75%含む改変マッコイ 5 A 培養液 0.4mlを混合し、直径35mmの組織培養用プラスチックディッシュに入れて固まらせた後、37℃、5%炭酸ガス/95%空気、100%湿度の条件にて5日間培養し、形成されたコロニー数(50個以上の細胞からなる集落を1コロニーとする)を数え、1個のコロニーを形成する活性を1単位(Unit)とした。

溶媒(A) : 30% n-プロパノール、

0.1%トリフルオロ酢酸

溶媒(B) : 60% n-プロパノール、

0.1%トリフルオロ酢酸

測定波長 : 210nm

$$\text{残存率 (\%)} = \frac{\text{所定時間経過後の残存量}}{\text{初期量}} \times 100$$

本法で測定されたG-C S Fの残存量は、上記(a)のマウス骨髄細胞を用いる軟寒天法の測定結果と極めて高い相関性を示した。

実施例 I

G-C S F 5 μgに第1表に示す糖類を添加したG-C S F 5 μg/ml含有製剤(20mMリン酸緩衝液、100mM塩化ナトリウム含有、pH7.4)を無菌的に調製し、次いで凍結乾燥製剤を製造した。G-C S F活性の経時変化は上記(a)マウス骨髄細胞を用いる軟寒天法で測定した。結果は第1表に示す。尚、表中活性(%)とは、初期単位に対する相対割合であり、以下の式で定義される。

尚、上記(a)の方法において用いた「改変マッコイ 5 A 培養液」は次の如くして作製した。

「改変マッコイ 5 A 培養液(2倍濃度)」

マッコイ 5 A 培養液〔ギブコ(GIBCO)社製〕12g、MEMアミノ酸ビタミン培地(日水製薬社製)2.55g、重炭酸ナトリウム2.18g、ペニシリンGカリウム 50000単位を2回蒸留水 500mlに溶解後、0.22 μmのミリポアフィルターにて濾過滅菌を行った後使用した。

(b) 逆相系高速液体クロマトグラフィー法

C 8 逆相カラム(4.6mm×300mm, 5 μm)を用い、n-プロパノール、トリフルオロ酢酸を移動相に使用し、G-C S Fとして1 μg相当量以上を注入し、以下のグラジエント条件で残存活性の測定をする。

時間	溶媒(A)	溶媒(B)	グラジエント条件
0分	100%	0%	直線的グラジエント
15分	0%	100%	
25分	100%	0%	

$$\text{活性 (\%)} = \frac{\text{所定時間経過後の活性単位}}{\text{初期活性単位}} \times 100$$

凍結乾燥条件は以下の通りである：
安定化剤を添加したG-C S F溶液を無菌サルファ処理ガラスバイアルに入れ、-40℃以下で4時間凍結し、-40℃から0℃、真空度0.03から0.1 Torrで、48時間一次乾燥した。次いで0℃から20℃、真空度0.03から0.08 Torrで12時間二次乾燥し、バイアル内部を無菌乾燥窒素ガスで大気圧になるまで置換する。次いで凍結乾燥用ゴム栓で打栓し、アルミニウムキャップで密封する。

第1表

糖の種類	添加量 (重量部)	活 性 (%)	
		4℃6ヶ月 保存後	37℃1ヶ月 保存後
キシリトール	10.000	92	86
マンニトール	10.000	91	85
グルクロン酸	10.000	86	82
ヒアルロン酸	2.000	92	89
デキストラン (分子量:40000)	2.000	95	90
ヘパリン	5.000	85	80
キトサン	2.000	93	91
アルギン酸	2.000	90	90
無添加	—	74	58

に無菌的に充填、密封してG-CSF溶液製剤を製造した。これらの溶液製剤について、G-CSF活性の経過時変化を実施例1と同様の方法で測定し、その結果を第2表に示した。

実施例2

G-CSF10 μ gに第2表に示す糖類を添加したG-CSF10 μ g/滅含有製剤(20mMリン酸緩衝液、100mM塩化ナトリウム含有、pH7.4)を無菌的に調製し、サルファ処理ガラスバイアル内

第2表

糖の種類	添加量 (重量部)	活 性 (%)		
		4℃7日間 保存後	4℃2ヶ月 保存後	室温1ヶ月 保存後
マンニトール	5000	91	87	82
ヒアルロン酸	2000	93	87	77
デキストラン (分子量:40000)	2000	96	95	85
グリセリン	10000	90	90	88
ノイリン酸	5000	93	91	84
キサン	2000	95	92	86
デキストリン	2000	90	92	87
無添加	—	72	61	47

実施例3

G-CSF10 μ gに第3表に示す糖類を添加したG-CSF10 μ g/滅含有製剤(20mMリン酸緩衝液、100mM塩化ナトリウム含有、pH7.4)を無菌的に調製し、サルファ処理シリコンコーティングガラスバイアル中に1 μ l充填し、4℃で放置し、0.5、2および24時間後の溶液中のG-CSFの残存活性を上記(4)の逆相系高速液体クロマトグラフィー法により測定し残存率(%)を求め、糖類のG-CSF吸着防止効果を評価した。その結果を第3表に示す。

第3表

糖の種類	添加量 (重量部)	残 存 率 (%)			
		初期値	0.5時間後	2時間後	24時間後
マンニトール	5000	100	93	90	91
ヒアルロン酸	2000	100	97	92	92
デキストラン (分子量:40000)	2000	100	98	95	96
グリセリン	10000	100	94	91	90
ヘパリン	2000	100	92	90	90
グルクロン酸	5000	100	96	90	91
ケトグリコール酸	5000	100	92	88	90
無添加	—	100	91	72	73

発明の効果

以上詳しく述べたように、本発明によれば、製薬上許容される糖類を所定濃度で用いたことにより、製剤中に極微量で存在するG-C-S-Fの温度、湿度、酸素、紫外線等の外的因子にもとずく会合、重合、あるいは酸化もしくは、容器壁等への吸着の結果として生ずる、有効成分の損失、活性の低下等に関する問題点を効果的に解決することが可能となった。

従って、虫者に対するG-C-S-F投与量を極めて正確に投与、管理することが可能となり、しかも高価なG-C-S-Fの有効利用ができ、G-C-S-F含有製剤のコスト節減を図ることも可能となる。

特許出願人 中外製薬株式会社
代 理 人 弁理士 越 場 隆